

PATENT COOPERATION TREATY

BEST AVAILABLE COPY From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 30 March 2001 (30.03.01)	
International application No. PCT/JP00/04617	Applicant's or agent's file reference FP-6750PCT
International filing date (day/month/year) 11 July 2000 (11.07.00)	Priority date (day/month/year) 28 July 1999 (28.07.99)
Applicant TATSUMI, Yoshiyuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
01 February 2001 (01.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Kiwa Mpay</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年2月1日 (01.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/07643 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/18, A61K
31/454, A61P 31/10, G01N 33/15, 33/50

(JP). 有可 正 (ARIKA, Tadashi) [JP/JP]; 〒565-0802
大阪府吹田市青葉丘南8-T201 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04617

(74) 代理人: 朝日奈宗太, 外 (ASAHINA, Sohta et al.); 〒
540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目2番22号 NS
ビル Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2000年7月11日 (11.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/214369 1999年7月28日 (28.07.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科研製薬
株式会社 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒113-8650 東京都文京区本駒込二丁目28番8
号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 巽 良之 (TAT-
SUMI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒520-0242 滋賀県大津市
本堅田6丁目21-1-709 Shiga (JP). 横尾 守 (YOKOO,
Mamoru) [JP/JP]; 〒520-0102 滋賀県大津市苗鹿2丁
目13-3 Shiga (JP). 中村公章 (NAKAMURA, Kosho)
[JP/JP]; 〒524-0002 滋賀県守山市小島町935-39 Shiga

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PATHOGENIC MICROORGANISM AND ANTIMICROBIAL AGENT, METHOD
FOR EVALUATING THE DRUG EFFECT OF ANTIMICROBIAL AGENT, AND ANTIMICROBIAL AGENTS

(54) 発明の名称: 病原微生物および抗微生物剤の検出法、抗微生物剤の薬効評価法ならびに抗微生物剤

(57) Abstract: A novel method for evaluating the drug effect of an antimicrobial agent which comprises eliminating the antimicro-
bial agent remaining in a biological sample, etc. to thereby accurately evaluate the drug effect of the antimicrobial agent without
being affected by the remaining antimicrobial agent. Remedies for nail mycosis which can be obtained by the drug effect evaluation
method as described above.

(57) 要約:

生体試料などに残留する抗微生物剤を除去することによ
り、残留する該抗微生物剤の影響を受けず正確に該抗
微生物剤の薬効を評価できる抗微生物剤の新規な薬効評
価法を提供する。また、該薬効評価法により得ることが
できた爪真菌症治療剤を提供する。

WO 01/07643 A1

明 細 書

病原微生物および抗微生物剤の検出法、
抗微生物剤の薬効評価法ならびに抗微生物剤

技術分野

本発明は、病原微生物の検出法、病原微生物に対する抗微生物剤の薬効評価法、および抗微生物剤の検出法に関する。また本発明は、前記薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤および爪真菌症治療剤に関する。

背景技術

新規な抗微生物剤（以下、薬剤ともいう）を探索するためには、動物モデルを用いた薬効評価法が必要であり、また、臨床上の治療効果を予知する上でも極めて重要であるため、薬効を正確に評価できる方法が必要である。

従来、白癬に対する抗真菌剤の薬効評価にはモルモットの背部、足底または趾間部にトリコフィトンメンタグロフィテス(Trichophyton mentagrophytes)を感染させる実験的白癬モデルが使用されている。これらの動物モデルはすでにいくつかの抗真菌剤の開発に用いられてきた。これら抗真菌剤の薬効評価は、感染動物に抗真菌剤を塗布し、一定期間経過後に皮膚を採取、裁断し複数の小断片に切り分け、この皮膚片を培地上で培養し、菌の発育が見られない断片の数またはすべての皮膚片で菌の発育が見られない動物または足の数を指標として行なわれている(Antimicrobial Agents and Chemotherapy、36:2523-2525, 1992, 39:2353-2355, 1995)。以下、

従来の薬効評価法を従来法という。

近年、白癬菌に対して強力なインビトロ活性を有しているラノコナゾール、アモロルフィンなどの薬剤が上市されたにも関わらず、臨床における治癒率の向上はあまり認められていない。その主な原因として、治療後に皮膚内の菌が完全に死滅していないために再び菌が増殖する再燃が指摘されている。

動物実験においても従来法でラノコナゾールのモルモット足白癬モデルにおける効果を評価すると、最終治療2日後では、20足中全足に菌の陰性化が観察されたが、最終治療30日後では20足中11足に再燃が観察され、最終治療2日後の効果と最終治療30日後の効果とのあいだに相関性が認められなかった(36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, Louisiana, 1996, Abstr.F80)。

この原因としては、ラノコナゾールは極めて強いインビトロ抗白癬活性を有しており、最終治療2日後では皮膚に殺菌作用を示す濃度の該薬剤がまだ残留しており、その皮膚を採取して菌の検出のために培地上で培養した際に、皮膚に残留する該薬剤が培地中に混入し、採取した皮膚内に菌が生存しているにもかかわらず培地上で菌の発育が阻止され菌が検出されなかったが、一方、最終治療30日後では皮膚内に残留する該薬剤の濃度が低下し、皮膚内の菌は再増殖することができ、それゆえ菌が検出されたと考えた。

この仮説をもとに、あらかじめ菌を含有させた培地上にラノコナゾールによる治療後の皮膚片を置き培養した結果、皮膚片の周囲で菌の発育は完全に阻止され、皮膚

内に該薬剤が残留していることが確認された。

したがって、従来法では皮膚内に残留する薬剤により見かけ上治療効果があるように評価されてしまい、薬効を正確に評価できないという問題点があることが明らかになった。

一方、真菌症の1種である白癬は皮膚糸状菌が皮膚(角質層)、爪および毛髪などのケラチン質に寄生することによって引き起こされる表在性の皮膚疾患であるが、とくに、爪に生じる爪白癬は、白癬による皮膚疾患の中でも難治性の疾患として知られ、爪甲の混濁、肥厚、破壊、変形などの症状を伴う。現在、この爪白癬の治療には経口剤(グリセオフルビン、タービナフィンなど)が用いられている。しかしながら、爪白癬を完全に治癒させるためには、半年以上という長期間服用しなければ治療効果が得られず、患者自身が服用を中断したり、または不規則な服用を行なうケースが多い。このことが爪白癬を完治することが難しい主な原因になっていると考えられている。また、長期間の服用によりグリセオフルビンでは内臓に対する副作用(胃腸障害、肝毒性)が問題となっており、タービナフィンについても副作用として肝毒性が報告されている。よって、患者のコンプライアンスを向上させるため、短期間で爪白癬を治癒させかつ経口剤と比較し全身性の副作用が少ない外用剤の開発が切望されている。

しかし、現在の外用抗真菌剤を爪甲に単純塗布した場合では薬剤が爪甲の厚い角質に十分に浸透できず、爪内の真菌に対して抗真菌効果を発揮することはできなかった。(Markus Niewerth and Hans C. Korting, Management of

Onychomycoses, Drugs, 58: 283-296 1999)

さらに、外用抗真菌剤の実験的白癬モデルにおける治療効果は、前述したように従来法では評価できない。このことが、現在までモルモットの爪白癬モデルに対する薬効の報告が極めて少なかった原因と考えられる。

発明の開示

本発明は、抗微生物剤、とくに抗真菌剤などの薬効を評価する場合、治療後の皮膚など動物または生体試料の病原微生物被感染部位に残留する薬剤を除いた上で評価するのが望ましいとの知見に基づき完成されたものであり、抗微生物剤の新規な薬効評価法および該薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤を提供することを目的とする。詳しくは、本発明は、動物または生体試料に抗微生物剤を投与し、ついで該抗微生物剤を除去したのち、前記動物または生体試料の病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出する方法および動物または生体試料の病原微生物被感染部位に残留する抗微生物剤の影響を受けず、正確に該抗微生物剤の薬効を評価できる抗微生物剤の薬効評価法を提供するものである。また本発明は、前記薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤、および抗微生物剤を投与した動物または生体試料の病原微生物被感染部位に存在する該抗微生物剤を検出する抗微生物剤の検出法を提供するものである。

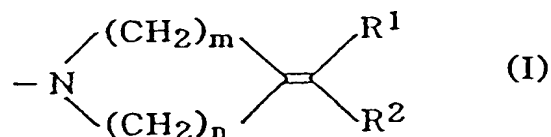
より具体的には、本発明によれば、病原微生物の検出および抗微生物剤の薬効評価は、動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物から

なる抗微生物剤を投与し、ついで前記抗微生物剤を除去したのち、病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出することにより、実施することができる。

また本発明によれば、病原微生物感染部位に存在する抗微生物剤の検出は、動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物からなる抗微生物剤を投与し、ついで病原微生物被感染部位を採取し、それを病原微生物を含む寒天培地上に置き培養後、前記病原微生物被感染部位の周囲における病原微生物の発育阻止を観察することにより実施することができる。

さらに、本発明はモルモット爪白癬モデルにおける抗真菌剤の正確な薬効評価を可能とする薬効評価法を提供することを目的とするものであり、また当該薬効評価法をもとに強力な抗真菌活性に加え、爪甲において良好な浸透性と貯留性、高い活性を保持することで、外用塗布で爪白癬に効果を発揮し、市販の経口剤と比較しても短時間で爪白癬を治癒することができる爪真菌症治療剤を提供することを目的とする。さらに、本発明は、治療上必要な量を十分に投与しても副作用を発現することのない効果的な爪真菌症治療剤を提供することを目的とする。

より具体的には、本発明は前記薬効評価法に基づき、式 (I) :



(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって水素原子、 $\text{C}_{1\sim 6}$ アルキル基、無置換またはハロゲン原子、トリフ

ルオロメチル基、ニトロ基および $C_{1\sim 6}$ アルキル基から選ばれた置換基 1 ～ 3 個で置換されたアリール基、 $C_{2\sim 8}$ アルケニル基、 $C_{2\sim 6}$ アルキニル基、または $C_{7\sim 12}$ アラルキル基を示し、 m は 2 または 3 を示し、 n は 1 または 2 を示す) で表される基を有する抗真菌化合物またはその塩を有効成分として含有する爪真菌症治療剤を提供するものである。

なお、「存在」には「残留」の意を含むものとする。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の抗微生物剤の検出法による従来法で最終治療 5 日後に評価したあとの皮膚における残留薬剤の確認のための写真のカラーコピーである。(a) は感染対照群を、(b) は K P - 1 0 3 治療群を、(c) はラノコナゾール治療群を示す。

図 2 は、本発明の抗微生物剤の検出法による最終治療 5 日後の皮膚からの薬剤除去後における残留薬剤の確認のための写真のカラーコピーである。(a) は感染対照群を、(b) は K P - 1 0 3 治療群を、(c) はラノコナゾール治療群を示す。

図 3 は、本発明の薬効評価法によるモルモット爪白癬モデルにおける各処置群の爪内菌数の分布を示す図である。

図 4 は、本発明の薬効評価法によるモルモット足白癬モデルにおける各処置群の皮膚内菌数の分布を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明に用いられる動物としては、哺乳類、たとえばマウス、ラット、モルモット、ウサギなどがあげられる。生体試料としては、これら動物から採取した背部または足裏部皮膚、爪などがあげられる。

これら動物または生体試料への病原微生物の感染方法としては、経皮、経口、経静脈、経気道、経鼻、腹腔内などの接種があげられる。とくに皮膚の場合、皮膚上に塗布する方法、真皮を露出させて該真皮上に塗布する方法、クローズドパッチ法、皮内注射法などがあげられる。また、爪の場合は、爪上に塗布する方法、前記皮膚への感染方法で動物の足皮膚に感染させた後、数ヵ月放置して感染を爪へ移行させる方法などがあげられる。

皮膚という語は、表皮、真皮および皮下組織の3層を含み、付属器官として毛、爪、脂腺、汗腺、乳腺などを伴う組織を意味する。表皮は表面から順に角質層、淡明層、顆粒層、有棘層、および基底層の5層に区別され、角質層、淡明層および顆粒層は広義の角質層とされる。本明細書における角質とは、前記角質層の一部を表わすものとする。

爪という語は、爪甲、爪床、爪母を含み、その周囲の組織の側爪郭、後爪郭、爪上皮、爪下皮までを意味する。

本発明で病原微生物という語は、何らかの形で人や動物に疾病を起こす微生物をいう。病原微生物（以下、微生物という）として具体的に、細菌としては、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、ナイセリア属 (*Neisseriaceae*) などの好気性グラム陰性桿菌および球菌、大腸菌 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*) などの通性嫌気性グラム陰性桿菌、ブ

ドウ球菌 (*Staphylococcus*)、連鎖球菌 (*Streptococcus*) などのグラム陽性球菌などが例示できる。真菌としては、トリコフィトン属 (*Trichophyton*)、ミクロスポーラム属 (*Microsporum*)、エピデルモフィトン属 (*Epidermophyton*) などの不完全糸状菌やカンジダ属 (*Candida*)、マラセチア属 (*Malassezia*) などの不完全酵母、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) の子囊菌類、ムコール属 (*Mucor*) の接合菌類およびこれらの変異株があげられる。これらの変異株としては、自然に薬剤に対して耐性を獲得した耐性株、栄養依存性を有するようになった栄養依存性変異株、変異原処理などを行ない人為的に変異させた人工変異株などが例示できる。

真菌症とは、真菌が人や動物の組織内に侵入し増殖して発症にいたった疾患群をいい、通常、表在性真菌症と深在性真菌症に大別され、前者では、皮膚と可視粘膜に病巣があり、後者では、内臓、中枢神経系、皮下組織、筋肉、骨、関節が侵される。とくに表在性真菌症の主なものとしては、トリコフィトン属、ミクロスポーラム属およびエピデルモフィトン属などの皮膚糸状菌の感染によって起こされる皮膚糸状菌症があり、白癬、黄癬および渦状癬の3疾患が含まれる。白癬は慣例的に皮膚糸状菌症と同義語的に用いられることがある。また、通常トリコフィトン属の皮膚糸状菌を白癬菌という。

本発明において、抗微生物剤とは、抗微生物作用を有する化合物、または、その化合物を含む組成物を意味し、組成物には人為的な組成物である剤形と天然抽出物などの人為的でない組成物とが含まれる。

本発明における抗微生物剤の投与は、その種類によっ

て異なり、外用塗布、経皮投与、経口投与または静脈内投与などがあげられる。

本発明にかかる病原微生物検出法、薬効評価法および抗微生物剤検出法を実施するに際し、微生物の感染と抗微生物剤の投与とは、いずれを先に行なってもよい。とくに本発明の薬効評価法（以下、本評価法という）においては、微生物の感染後に抗微生物剤の投与を行なえば抗微生物剤の治療効果を評価でき、一方、抗微生物剤の投与を行なったあと微生物を感染させる場合は抗微生物剤の感染予防作用およびその貯留性を評価することができる。抗微生物剤の貯留性を評価する場合には、抗微生物剤投与後、微生物感染までの期間を変化させて評価すればよい。

本発明において、抗微生物剤の除去には、検出対象となる微生物ないし本評価法などに用いられる微生物に影響を与えなければとくに限定されるものではないが、簡便性の点で透析または限外ろ過が好適に使用される。

透析には市販のセルロース製の透析膜が便利であるが、その他の材質であっても検出対象となる微生物ないし本評価法などに用いられる微生物が通過せず、抗微生物剤が透過できる膜であれば問題なく使用できる。大部分の真菌および細菌の大きさは $0.2\mu\text{m}$ 以上であることから、孔径が $0.2\mu\text{m}$ 未満の膜が望ましく、とくに、分画分子量 $1000\sim50000$ の透析膜が好適に使用できる。

透析に用いる外液は、生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝化生理食塩液および他の緩衝液などがあげられる。

本発明における抗微生物剤の除去では、微生物被感染

部位が皮膚のみならず爪や臓器などの場合でも該抗微生物剤を効率良く除去することができる。通常、皮膚に比べ爪からの抗微生物剤除去には長期間の透析を必要とする場合があり、除去効果を高めるには後述の消化酵素処理を除去前に行なってもよい。

透析条件は該抗微生物剤の種類、投与濃度、投与期間および休薬期間（最終治療日から評価までの期間）によって異なるため、後述する本発明の微生物被感染部位に存在する抗微生物剤の検出法（以下、本薬剤検出法という）などにより、事前に治療後の皮膚から該抗微生物剤を除去できる透析条件を個々の場合について調べ、適宜調整すればよい。

抗微生物剤が除去されていることを確認するには以下の方法により容易に行なうことができる。

本薬剤検出法は、前記抗微生物剤の除去方法により処理した微生物被感染部位、たとえば皮膚片など、または、後述する該皮膚片などからの微生物の抽出操作にしたがって得た懸濁液を、該皮膚片などの感染に使用した微生物を含む寒天培地上に置き、培養後、それらの周囲に観察される微生物の発育阻止を観察することにより行なう。残留抗微生物剤が存在する場合、微生物の発育阻止が観察されることになる。

本評価法は、とくに、適切な抗微生物剤の除去が行なわれたあと前記本薬剤検出法により抗微生物剤の除去が確認された皮膚片などを培地上に置いて培養し、微生物の発育の有無を観察したり、または該皮膚片などから微生物の抽出操作によって得られた懸濁液を寒天培地に塗抹して培養し、培養後、微生物の発育の有無を観察した

り、培地上に出現したコロニー数を計測することにより行なうことができる。

皮膚および爪などの生体試料から微生物を効率良く抽出するためにトリプシン処理を行なうことができるがとくに限定されるものではなく、トリプシン以外のプロナーゼ、ケラチナーゼ等の消化酵素や尿素などの角質溶解剤も抽出効果が確認されれば使用可能である。ただし、トリプシンなどの消化酵素や角質溶解剤の処理濃度および反応時間は微生物への影響の無い範囲で設定する必要がある。トリプシンなどの消化酵素の処理は透析の前および後のいずれに行なってもよい。ただし、透析前にトリプシン処理を行なった場合は透析の際には微生物への影響を無くするために消化酵素を十分に除去しておかなければならない。

本発明において、微生物の培養に用いる培地としては、通常、培養や菌分離などに用いているものであれば問題はなく、たとえば、真菌ではサブロー培地、改変サブロー培地、ツアベック寒天培地、ポテトデキストロース寒天培地などが例示できる。一方、細菌については、ミュラー・ヒントン培地、改変ミュラー・ヒントン培地、ハート・インヒュージョン寒天培地、ブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地、普通寒天培地などが例示できる。

微生物の培養温度は、10～40℃、好ましくは20～40℃で微生物が生育するのに十分な時間、たとえば真菌では1～20日間、細菌では1～5日間静置培養すれば良い。

本評価法は、動物の生体から摘出した皮膚、爪などに

微生物を感染させたあと、被検体として抗微生物剤を投与し、しかるあとに該抗微生物剤を除き、試料内の微生物を検出し定量するエキソピボでの薬効評価法としても利用できる。

また、本評価法は、表在性真菌症治療剤の薬効評価のみならず、深在性真菌症治療剤、抗細菌剤などの抗微生物剤の評価にも応用できる。すなわち、動物に経皮、経口、経静脈、経気道、経鼻、腹腔内などの接種により真菌、細菌などの微生物を感染させたあと、抗微生物剤を投与し、しかるのちに皮膚、腎臓、肺、脳などの生体試料を採取し、該生体試料に残留している該抗微生物剤を除いたあとに該生体試料に生存する微生物を検出することで、深在性真菌症治療剤や抗細菌剤の薬効評価が可能である。

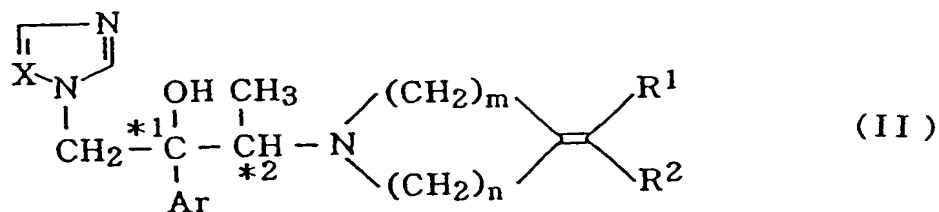
さらに、本評価法では、治療した生体試料中の生存微生物数を測定することで、抗微生物作用の定量的な比較が可能となる。

すなわち、薬剤治療群および感染対照群における微生物被感染部位での微生物数を、クラスカル-ワーリス検定 (Kruskal-Wallis Test) などの統計学的方法を用いて有意差検定を行なった上で、チューキー (Tukey) 法などの多重比較を行ない、群間の定量的な比較ができる。

また、本発明は、真菌が感染した真菌症患者に抗真菌剤を投与したのちに、その薬効を評価する方法として、あるいは角質または爪に存在する抗真菌剤を検出する方法としても有用である。たとえば、本発明によれば、真菌が皮膚または爪に感染した患者に、抗真菌剤を投与し、そののち角質または爪を採取し、ついで前記抗真菌剤を

除去したのち、角質または爪に生存する真菌を検出することにより抗真菌剤の薬効を評価することができる。また、本発明によれば、真菌が皮膚または爪に感染した患者に、抗真菌剤を投与し、そののち角質または爪を採取し、それを真菌を含む寒天培地上に置き培養後、前記角質または爪の周囲に観察される真菌の発育阻止により前記角質または爪に存在する抗真菌剤を検出することにより、抗真菌剤の検出を行なうことができる。このような、真菌症患者に投与した抗真菌剤の薬効評価および角質または爪からの該抗真菌剤の検出は、前述した動物または生体試料に投与した抗微生物剤の薬効評価法および検出法を用いて同様に行なうことができる。

さらに、本発明によれば、本評価法に基づき、各種の有用な抗微生物剤が提供される。本評価法に基づいて得られる抗微生物剤としては、生体内での除菌効果を有する化合物またはそれを含有する表在性真菌症、深在性真菌症または細菌感染症の治療のための組成物からなる抗微生物剤であり、統計学的に有意な効果を示し選択される真の薬効を持った抗微生物剤、さらには、本評価法によりその薬剤の純粋な抗微生物活性が明らかにされて選択される生体内での除菌効果に優れる抗微生物剤または再燃を起こさない完治型の抗微生物剤をあげることができる。具体例としては、前記式(I)で表わされる基を有する化合物からなる爪真菌症治療剤があげられ、このうち、より好ましい具体例としては、式(II)：



(式中、Arは無置換またはハロゲン原子およびトリフルオロメチルから選ばれた置換基1～3個で置換されたフェニル基を示し、 R^1 および R^2 は、同一または異なって水素原子、 $C_{1\sim6}$ アルキル基、無置換またはハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基および $C_{1\sim6}$ アルキル基から選ばれた置換基1～3個で置換されたアリール基、 $C_{2\sim8}$ アルケニル基、 $C_{2\sim6}$ アルキニル基、または $C_{7\sim12}$ アラルキル基を示し、 m は2または3を示し、 n は1または2を示し、 X は窒素原子またはCHを示し、*1、*2は不斉炭素を示す)で表される化合物からなる爪真菌症治療剤があげられる。

当該式(I)および(II)において、置換されたフェニル基としてはハロゲン原子およびトリフルオロメチルから選ばれた1～3個の置換基を有するフェニル基であり、たとえば2,4-ジフルオロフェニル、2,4-ジクロロフェニル、4-フルオロフェニル、4-クロロフェニル、2-クロロフェニル、4-トリフルオロメチルフェニル、2-クロロ-4-フルオロフェニルまたは4-ブロモフェニルなどがあげられ、 $C_{1\sim6}$ アルキル基としてはたとえばメチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、 n -ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、*tert*-ペンチル、シクロヘキシルなどの炭素数1～6の直鎖、分岐鎖または環状アルキル基があげられ、無置換アリール基としては、たとえばフェニル、ナフチルまたはビフェニルなどがあげられ、置換アリール基としては、たとえば2,4-ジフルオロフェニル、2,4-ジクロロフェニル、4-フルオロフェニル、4

ークロロフェニル、2-クロロフェニル、4-トリフルオロメチルフェニル、2-クロロ-4-フルオロフェニル、4-ブロモフェニル、4-tert-ブチルフェニルまたは4-ニトロフェニルなどがあげられ、 $C_{2\sim 8}$ アルケニル基としては、たとえばビニル、1-プロペニルまたはスチリルなどがあげられ、 $C_{2\sim 6}$ アルキニル基としては、たとえばエチニルなどがあげられ、 $C_{7\sim 12}$ アラキル基としては、たとえばベンジル、ナフチルメチルまたは4-ニトロベンジルなどがあげられる。

また前記抗微生物剤のうち、とりわけ好ましい化合物としては、後述するKP-103のような薬効を示す化合物があげられる。

前記KP-103は、化学名：(2R, 3R)-2-(2, 4-ジフルオロフェニル)-3-(4-メチレンピペリジン-1-イル)-1-(1H-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)ブタン-2-オールで表わされる抗真菌剤を意味する。当該化合物は、たとえば国際公開公報WO 94/26734明細書(実施例1)に基づき、(2R, 3S)-2-(2, 4-ジフルオロフェニル)-3-メチル-2-[(1H-1, 2, 4-トリアゾール-1-イル)メチル]オキシランと4-メチレンピペリジンとを反応させ、製造することができる。

また、本発明で爪真菌症治療剤として使用するKP-103はこれまでに抗真菌活性が知られている(国際公開公報WO 94/26734)が、爪真菌症への効果は確認されていない。

そのようにして得られた抗微生物剤は、薬剤組成物として用いることもでき、微生物を殺菌するための薬剤組

成物として用いることができる。したがって、真菌症などの疾患を完全に治療し再燃を防止する薬剤組成物ともなる。

爪真菌症とは、前記表在性真菌症の一種であり、真菌が人や動物の爪に侵入し増殖して発症にいたった疾患群をいい、人の爪真菌症の主な原因菌はトリコフィトン属のトリコフィトン ルブルム (*Trichophyton rubrum*) およびトリコフィトン メンタグロフィテス (*Trichophyton mentagrophytes*) である。希にミクロスポーラム属、エピデルモフィトン属、カンジダ属、アスペルギルス属、フザリウム属などが原因菌となることがある。

本発明の爪真菌症治療剤の適応症としては、原因菌がトリコフィトン属の場合の爪白癬、カンジダ属の場合の爪カンジダ症、そのほかの真菌の場合の爪真菌症（狭義）があげられる。

本発明における抗微生物剤の一種である爪真菌症治療剤は、外用剤として投与する場合、液剤、クリーム剤、軟膏剤、マニキュア製剤などの剤形が考えられる。これら製剤を調製するにあたっては、油性基剤または乳剤性基剤など用いて調製することができ、有効成分として好ましい含量は0.1～10重量%である。投与量は患部の広さおよび症状によって適宜調節すればよい。

経口剤の場合、粉末、錠剤、顆粒剤、カプセル剤またはシロップとして使用され、さらには皮下、筋肉内または静脈内注射剤などの注射剤としても使用される。

本発明において、爪真菌症治療剤の投与量は患者の年齢、体重および個々の条件により異なるが、成人1日当たり有効成分として10mg～10g、好ましくは50

mg ~ 5 g 程度であり、投与方法としては上記 1 日当たりの投与量を 1 回ないし数回に分けて投与する。

以下に実施例をあげてさらに詳しく本発明について説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[比較例 1 および実施例 1 ~ 3 の前処理]

[1] 菌液の調製とモルモット趾間型足白癬モデルの作成

ブレインハートインヒュージョン寒天培地（日水製薬（株）製）上にミリポアフィルター（HA、直径 47 mm、0.45 μ m、Millipore 社製）を乗せ、その上にトリコフィトン メンタグロフィテス KD-04 株 (*Trichophyton mentagrophytes* KD-04) の小分生子 10^6 個を塗抹したあと、17% CO_2 存在下、30℃で 7 日間培養した。培養後、フィルター上に 0.05% ツイン (Tween) 80 添加生理食塩水を適量滴下し、白金耳を用いて分節胞子を回収した。菌糸塊を滅菌ガーゼでろ過し除去後、ろ液中の分節胞子数を血球計算盤で算定し、 1×10^8 分節胞子 / ml の濃度に調整し、接種菌液とした。

有可らの方法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36:2523-2525, 1992) に準じてモルモット趾間型足白癬モデルを作成した。すなわち、Hartley 系 7 週齢雄性モルモットの後足 2 足の趾間部皮膚を軽くサンドペーパーで擦過したあと、趾間部に前記接種菌液に浸漬したペーパーディスク (Whatman 社製の AAdisk を 8 × 4 mm に切断) を挿入したあと、Self-adhering-Foam Pad (Restone 1560M、3M 社製) および粘着性布伸縮包帯 (エラストポア、ニチバン (株) 製) で固定した。感染

7 日後にペーパーディスクおよび包帯を除去した。

[2] 液剤の調製およびモルモット趾間型足白癬に対する塗布治療

被検体としては市販の 1 % ラノコナゾール液剤（商品名：アスタット液）および K P - 1 0 3 をポリエチレングリコール # 4 0 0 : エタノール（7 5 : 2 5 v / v）混液に 1 % 濃度で溶解した液剤を用いた。感染 1 0 日後から 1 日 1 回、1 0 日間、0 . 1 m l を足裏皮膚に塗布治療した。

比較例 1 従来の薬効評価法

以下に、従来法を記述する。薬剤の塗布を行っていない感染対照群、K P - 1 0 3 治療群およびラノコナゾール治療群の各群につきモルモット（以下、動物という）1 0 匹とし、最終治療の 2 日後および 3 0 日後にそれぞれの群の動物を安楽死させたあと後足 2 足を採取し酒精綿で十分に清拭したあと、足裏皮膚を切り出し、足底部から 1 2 個および足指部から 3 個の計 1 5 個の皮膚片に切り分けた。皮膚片をクロラムフェニコール（和光純薬工業（株）製）5 0 μ g / m l、ゲンタマイシン（シェーリング・プラウ）1 0 0 μ g / m l、5 - フルオロシトシン（和光純薬工業（株）製）5 0 μ g / m l、シクロヘキシミド（ナカライテスク（株）製）1 m g / m l を含むサブローデキストロースアガー（Difco 社製）培地（2 0 m l）の上に乗せた。培地に添加した抗生物質は細菌を生育させない一方、真菌の生育には支障の無い条件で設定した。3 0 $^{\circ}$ C で 1 0 日間培養したあと、すべての皮膚片に菌の発育が観察されない場合を菌陰性化とし菌陰性化足数を求めた。最終治療 3 0 日後の薬効評価

においては、再感染防止のために最終治療の2日後に治療足を酒精綿で清拭したあと足を包帯で固定し、包帯を1週間毎に交換した。最終治療2日後と30日後のKP-103およびラノコナゾールの治療効果を表1に示す。

表 1

被 験 体	菌 陰 性 化 足 数 / 全 感 染 足 数	
	最 終 治 療 2 日 後	最 終 治 療 3 0 日 後
感 染 対 照	0 / 20	0 / 20
KP-103	20 / 20	16 / 20
ラノコナゾール	20 / 20	9 / 20

表1からわかるように、KP-103治療群では最終治療2日後において全足で菌の陰性化が観察され、最終治療30日後においても20足中16足で菌の陰性化が観察された。一方、ラノコナゾール治療群では最終治療2日後においては全足で菌の陰性化が観察されたが、最終治療30日後では9足で菌の陰性化が観察されたに過ぎず、最終治療2日後と30日後で治療効果に相関性が認められなかった。ラノコナゾールは白癬菌に対して強力なインビトロ活性を有しており、本試験菌株に対するインビトロ抗真菌活性もKP-103と比較し8倍強く、15.6 ng / mlで菌の発育を阻止するにもかかわらず、最終治療30日後での菌の陰性化足数が減少してしまっているのは、最終治療2日後に認められたラノコナゾールの治療効果は治療後の皮膚に残留した薬剤が培養系に混入し皮膚中の菌の発育が阻止されたことによるものと推測し、残留薬剤の確認試験を行なった。

実施例1 従来法で最終治療5日後に評価したあとの皮

膚における残留薬剤の確認

比較例 1 に準じてモデルを作成し、被検体のラノコナゾールは K P - 1 0 3 と同一の基剤を用いて 1 % 液剤を調製し治療実験に供した。薬剤の塗布を行っていない感染対照群、K P - 1 0 3 治療群およびラノコナゾール治療群の各群につき動物 2 0 匹とし、最終治療 5 日後に比較例 1 と同様にして各動物から後足 2 足ずつを採取し、左足計 2 0 足を従来法での評価に用い、右足計 2 0 足を本評価法での評価に用いた。

最終治療 5 日後に比較例 1 と同様に菌の生育を観察し薬効評価を行なったあとの左足の皮膚片を、トリコフィトン メンタグロフィテス K D - 0 4 株 (2×10^4 個 / m l) および比較例 1 に記載の抗生物質を含むサブローデキストロースアガー培地 (2 0 m l) 上に移し、3 0 °C で 3 日間培養した。培養後、皮膚の周囲に出現した菌の発育阻止円を観察し 2 0 足中 1 0 足について写真撮影を行なった。図 1 は、前記条件で培養したあとの写真を電子化したものである。(a) は薬剤を塗布していない感染対照群、(b) は K P - 1 0 3 治療群、および (c) はラノコナゾール治療群を示す。(a) 感染対照群の各動物それぞれに対応する 1 0 個のシャーレの内 1 つを代表して説明するが、図 1 中、S は動物に由来する 1 5 個の足裏皮膚片の内 1 つを、M は前記培地を示す。(b) K P - 1 0 3 治療群および (c) ラノコナゾール治療群に記載の S および M も同様である。培地において白く見られる部分では菌の発育が生じており、一方、黒く見られる部分では菌の発育が阻止されている。

図 1 からわかるように、薬剤を塗布していない感染対

照群の皮膚片の周囲においては良好な菌の発育が見られた。K P - 1 0 3 治療群の皮膚片の周囲においては菌の発育は感染対照群と比較し若干阻害されたものの、すべての皮膚片において菌の増殖が観察された。一方、ラノコナゾール治療後の皮膚片の周囲において菌の発育は完全に阻止された。これらの結果から、表 1 で示した従来法でのラノコナゾールの治療効果は皮膚に残留した薬剤が培養系に混入し菌の発育を阻止し、見かけ上治療効果を示していたと考えられた。

したがって、従来法では薬効を正確に評価できないことが明らかとなった。

実施例 2 皮膚からの薬剤除去後における残留薬剤の確認

実施例 1 において最終治療 5 日後に各動物から右足 2 0 足を採取したあと、酒精綿で十分に清拭し足裏皮膚を切り取った。皮膚をハサミで十分に切り刻んだあとに、透析膜（分画分子量：1 2 0 0 0 ～ 1 4 0 0 0、セルロース製、VISKASE SALES 社製）に入れ、蒸留水 4 m l を加え、蒸留水 3 L 中で 4 ℃ で 2 日間透析した。透析水は 1 日 2 回合計 4 回交換した。内容物をガラスホモジナイザーに移し、4 % ブタ膵臓由来トリプシン（BIOZYME 社製）を含む 2 倍濃度のリン酸緩衝化生理食塩液 4 m l を加え、ホモジナイズした。3 7 ℃ で 1 時間放置した。2 枚重ねのガーゼでろ過し、ろ液を遠心分離した。上清を除去した沈澱物に 2 % トリプシンを含むリン酸緩衝化生理食塩液 8 m l を加え、さらに 3 7 ℃ で 1 時間振盪して反応させた。遠心分離後、上清を除去した沈澱物をリン酸緩衝化生理食塩液で遠心分離にて 3 回洗浄しトリプシンを除去した。沈澱物に同生理食塩液 2 m l を加え懸濁

液とした。

なお、本実施例で使用したのと同じ菌を用いて、透析操作およびトリプシン処理を実施したが、該菌の生存率に対しこれら操作による影響は全く見られなかった。

あらかじめ、トリコフィトン メンタグロフィテス K D - 0 4 株 (2×10^4 個 / ml) および比較例 1 に記載の抗生物質を含むサブローデキストロースアガー培地 (20 ml) の中央にウエルを作成した。ウエルの中に前記懸濁液 100 μ l を添加し、30℃で3日間培養した。培養後、出現した菌の発育阻止円を観察したあと20足中10足について写真撮影を行なった。図2は、前記条件で培養したあとの写真を電子化したものである。

(a) は薬剤を塗布していない感染対照群、(b) は K P - 1 0 3 治療群、および (c) はラノコナゾール治療群を示す。(a) 感染対照群の各動物それぞれに対応する10個のシャーレの内1つを代表して説明するが、図2中、Eは動物の足裏皮膚から調製した懸濁液を、Mは前記培地を示す。(b) K P - 1 0 3 治療群および(c) ラノコナゾール治療群に記載のEおよびMも同様である。培地全体において白く見られる部分では菌の発育が生じており、一方、ウエルの周辺の黒く見られる部分では菌の発育が阻止されている。

図1において従来法ではラノコナゾール治療群の最終治療5日後の皮膚の周辺には菌の発育が全く見られず、皮膚における薬剤の残留が確認された。これに対して、図2ではラノコナゾール治療群の最終治療5日後の皮膚を本発明における透析処理による薬剤の除去を行なったのち得た懸濁液では10足中2足で菌の発育阻止円が若

干観察されたものの、残り 8 足では菌の発育阻止円はほとんど観察されなかった。

これより、本発明における透析処理により、治療後の皮膚に残留する薬剤は十分に除けることが明らかとなり、したがって薬剤の薬効評価の際には残留薬剤の影響を受けないことが確認できた。

実施例 3 皮膚内生存菌の検出および薬効評価

比較例 1 に記載の抗生物質を含むサブローデキストロースアガー培地（20 ml）2 枚ずつに前記実施例 2 で得た各動物の右足 1 足の懸濁液をそれぞれ 100 μ l ずつ塗布し、30℃で 10 日間培養した。培養後、培地 2 枚に菌のコロニーが観察されない場合を菌陰性化とし（検出限界：10 個／足）菌陰性化足数を求めた。一方、左足 20 足については比較例 1 と同様の方法により評価した。従来法と本評価法での治療効果の比較の結果を表 2 に示す。

表 2

被 験 体	菌 陰 性 化 足 数 ／ 全 感 染 足 数	
	従 来 法	本 評 価 法
感 染 対 照	0 / 20	0 / 20
KP-103	19 / 20	17 / 20
ラノコナゾール	20 / 20	3 / 20

表 2 に示すように、KP-103 治療群では従来法および本評価法のいずれで評価しても菌陰性化足数に大きな差は認められず、本評価法での該薬剤の菌陰性化足の割合は 85% であることがわかった。一方、ラノコナゾール治療群では従来法において全足で菌の陰性化が観察

されたが、本評価法では3足で菌陰性化が観察されたに過ぎなかった。

以上より、本評価法は治療後の残留薬剤の影響を受けず真の薬効を評価できることが明らかとなった。

さらに、本評価法での結果は比較例1に記載の従来法での最終治療30日後に評価した時の結果と相関していたことから、本評価法では治療後の早い時期の評価により抗微生物剤の再燃防止効果の予測が可能であることが明らかとなり、それゆえ、本評価法により、再燃を起こさない完治型の抗微生物剤を得ることが可能である。

[実施例4および5の前処理]

[1] 菌液の調製とモルモット爪および足白癬モデルの作成

前記比較例1の前処理の菌液の調製において、菌株トリコフィトン メンタグロフィテス KD-04株を、トリコフィトン メンタグロフィテス SM-110株とし、そのほかは同一の方法で菌液を調製した。

前記モルモット趾間型足白癬モデルの作成において、Hartley系7週齢雄性モルモットを、Hartley系5週齢雄性モルモットとし、感染7日後にペーパーディスクおよび包帯を除去したところを、感染21日後とし、その他は同一の方法でモルモット爪および足白癬モデルを作成した。感染60日後において足裏皮膚および爪甲内への白癬菌の感染が確認された。

[2] 被検物質の調製およびモルモット爪および足白癬に対する治療

被検物質として液剤はKP-103、アモロルフィンおよびターピナフィン原末をそれぞれポリエチレングリ

コール # 4 0 0 : エタノール (7 5 : 2 5 v / v) 混液に 1 % 濃度で溶解し調製した。タービナフィンのカプセル剤は市販の錠剤を破砕したのち、ミグリオール 8 1 2 (ミツバ貿易 (株)) に 100mg / ml になるようにガラスホモジナイザーを用いて均一に懸濁させ、投与当日に体重を測定し、40mg / kg になるようにカプセルに分注し調製した。感染 6 0 日目から 1 日 1 回、連日 3 0 日間、K P - 1 0 3、アモロルフィンおよびタービナフィンの液剤 0 . 1 m l を 1 足の足裏皮膚および爪に塗布し、タービナフィンのカプセル剤は 1 カプセル (40mg / kg) を経口投与した。

実施例 4 爪白癬に対する薬効評価

爪白癬に対する効果は以下の方法で評価した。

最終治療の 2 日後に動物を安楽死させたのちに各動物の後足を採取し酒精綿で十分に清拭した。後足 1 足分の爪 (計 3 個) を切り出し、ハサミで十分に切り刻んだのちに、ガラスホモジナイザーに移し、2 % ブタ腓臓由来トリプシン (BIOZYME 社製) を含むリン酸緩衝化生理食塩液 (Phosphate Buffered Salts、宝酒造株式会社製) 4 m l を加え、ホモジナイズした。37℃で 1 時間振盪して反応させた。遠心分離した後、沈澱物をリン酸緩衝化生理食塩液で 3 回遠心洗浄することでトリプシンを除去した。沈澱物に滅菌蒸留水 4 m l を加え、懸濁したのち、透析膜 (分画分子量 : 1 2 0 0 0 ~ 1 4 0 0 0、セルロース製、VISKASE SALES 社製) に入れ、蒸留水 3 L 中、4℃で 1 4 日間透析した。透析水は 1 日 2 回合計 2 8 回交換した。遠心分離後、上清を除去した沈殿に生理食塩液 1 m l を加え懸濁液とした。これを原液とし

て 10 倍ずつ希釈した。原液または希釈液 100 μ l を比較例 1 記載の抗生物質を含むサブローデキストロースアガー (Difco 社製) 培地 (20 ml) に塗布し、30℃で 10 日間培養した。培養後、すべての培地に菌のコロニーが観察されない場合を菌陰性化とし (検出限界: 10 個/足) 爪内菌陰性化足数を求めた。培地上にコロニーが出現した場合はそのコロニー数 (CFU) を計測し、希釈率を乗じて 1 足あたりの爪内菌数を算出した。爪内菌数はクラスカル-ワーリス検定を行なった上で、チューキー法に基づく多重比較を行ない群間の有意差を解析した。それらの結果を図 3 に示し、それを表 3 にまとめた。図 3 においては、各処置群の爪内菌数をプロットし、それらの平均菌数を横線および数値で表わした。

前記懸濁液を用い実施例 2 と同様に本薬剤検出法により残留薬剤の確認を行ない、残留薬剤が十分に除去できていることを確認した。

実施例 5 足白癬に対する薬効評価

実施例 4 に記載した各動物から、後足の足裏皮膚を切り取り、前記実施例 2 の薬剤除去および残留薬剤の確認において、残留薬剤除去のための透析期間を 3 日間、透析水の交換を合計 6 回とし、そのほかは同一の方法で薬剤除去および残留薬剤の確認を行ない、残留薬剤が十分に除去できていることを確認した。

ついで、実施例 4 と同様の方法で薬効評価を行なった (検出限界: 20 個/足)。それらの結果を図 4 に示し、それを表 4 にまとめた。図 4 においては、各処置群の皮膚内菌数をプロットし、それらの平均菌数を横線および数値で表わした。

表 3

被 験 体	爪 内 菌 陰 性 化 足 数 ／ 全 感 染 足 数	爪 内 平 均 菌 数 (Log CFU \pm SD)
外 用 基 剤	0 / 10	3.70 \pm 0.44
KP-103液 剤	0 / 10	2.20 \pm 0.56 **
アモロルフィン液 剤	0 / 10	3.26 \pm 0.54
タービナフィン液 剤	0 / 10	3.21 \pm 0.47
経 口 基 剤	0 / 10	3.76 \pm 0.67
タービナフィン経 口 剤	0 / 10	3.80 \pm 0.44

** : 外用基剤、経口基剤およびタービナフィン経口剤に対する有意水準0.01%での有意差を示す。

図3および表3に示すように、いずれの群においても30日間治療では爪内菌陰性化足は観察されなかった。しかし、KP-103は外用基剤と比較して有意に爪内菌数を減少させ、その治療効果は経口タービナフィンと比較し有意に優れていた。一方、アモロルフィンおよびタービナフィン（外用、経口）では基剤と比較して有意な殺菌効果は認められず、治療効果を発揮することはできなかった。以上より、KP-103は外用塗布で爪白癬に対して効果を発揮し、経口タービナフィンと比較し早期に爪白癬を治癒できることが示唆された。

表 4

被 験 体	皮膚内菌陰性化足数 ／全感染足数	皮膚内平均菌数 (Log CFU±SD)
外用基剤	0／10	4.37±0.33
KP-103液剤	10／10 **	< 1.3 **
アモロルフィン液剤	4／10	1.74±0.45 *
タービナフィン液剤	10／10 **	< 1.3 **
経口基剤	0／10	3.85±0.68
タービナフィン経口剤	10／10 **	< 1.3 **

* :外用基剤に対する有意水準0.05%での有意差有意差を示す。

** :外用基剤および経口基剤に対する有意水準0.01%での有意差有意差を示す。

図4および表4に示すように、KP-103、タービナフィン、アモロルフィンのいずれの薬剤も足白癬に対して菌陰性化足の割合および皮膚内菌数のいずれで評価しても優れた治療効果を示した。一方、図3および表3で示したようにタービナフィンおよびアモロルフィンは爪白癬には治療効果を示さなかったが、KP-103は爪白癬に対しても優れた殺菌効果を示すことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

前記のとおり、最近開発されたラノコナゾールのような白癬菌に対して極めて強力なインビトロ活性を有する薬剤は従来法で評価すると治療後の皮膚に残留する薬剤により、皮膚内の菌の発育が阻止され、皮膚内に治療されなかった菌が存在しているにも関わらず菌陰性と判定されている。

これに対して本発明は、治療後の皮膚などの動物または生体試料の微生物被感染部位を透析膜などを用いて透析することにより残留する抗微生物剤を除けるため、正確に抗微生物剤の薬効を評価することができる。さらには、従来法では抗真菌作用などの抗微生物作用の定量的な比較は困難であったが、本評価法では皮膚などの動物または生体試料の微生物被感染部位に生存する微生物数が正確に定量できるため抗微生物作用の定量的な比較も出来る。また、本評価法での治療効果は従来法での再燃の結果を反映しており、本評価法により治療後の早い時期の評価により再燃の防止効果を予測することができる。したがって、本評価法では、抗微生物剤の真の薬効を評価でき、さらには生体内での除菌効果に優れる抗微生物剤または再燃を起こさない完治型の抗微生物剤を選択することが可能となる。以上のことから、本評価法は抗微生物剤の評価法として非常に有用性が高い。

また、爪真菌症においては、本評価法により爪白癬モデルにおける爪真菌症治療効果を正確に評価することが初めて可能となった。

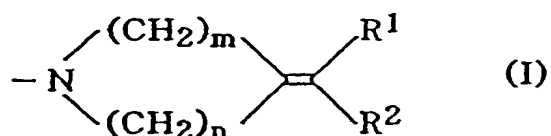
本評価法により爪真菌症治療効果を評価した結果、K P - 1 0 3 は、従来の外用抗真菌剤では効果が得られなかった爪真菌症に対して単純塗布で優れた治療効果を発揮することが明らかとなった。外用塗布であるため、経口剤に見られる全身性の副作用が無く、さらには、臨床使用されている経口剤と比較しても短期間で爪真菌症を治癒させるために患者のコンプライアンスの向上も期待できる。したがって、爪真菌症治療剤として産業上大変有益である。

請求の範囲

1. 動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物からなる抗微生物剤を投与し、ついで前記抗微生物剤を除去したのち、病原微生物被感染部位に生存する病原微生物を検出する病原微生物の検出法。
2. 前記病原微生物が細菌または真菌である請求の範囲第1項記載の病原微生物の検出法。
3. 前記真菌が表在性真菌症または深在性真菌症の原因菌である請求の範囲第2項記載の病原微生物の検出法。
4. 前記抗微生物剤が表在性真菌症治療剤、深在性真菌症治療剤または抗細菌剤である請求の範囲第1項記載の病原微生物の検出法。
5. 前記抗微生物剤を透析または限外ろ過により除去する請求の範囲第1項記載の病原微生物の検出法。
6. 前記病原微生物被感染部位が皮膚または爪である請求の範囲第1項記載の病原微生物の検出法。
7. 前記抗微生物剤の投与を経皮投与、経口投与または静脈内投与により行なう請求の範囲第1項記載の病原微生物の検出法。
8. 病原微生物の検出のため病原微生物被感染部位を消化酵素処理する請求の範囲第1項記載の病原微生物の検出法。
9. 請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項、第6項、第7項または第8項記載の病原微生物の検出法により病原微生物を検出することからなる抗微

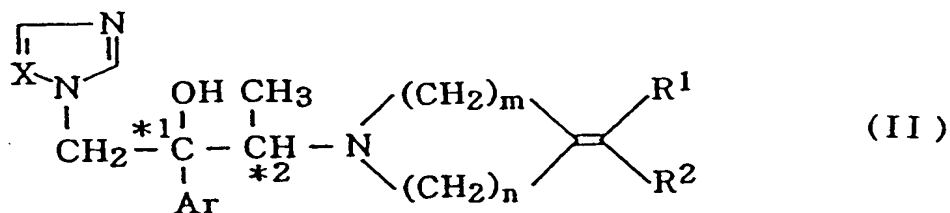
生物剤の薬効評価法。

10. 請求の範囲第9項記載の抗微生物剤の薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤。
11. 動物または生体試料に病原微生物を感染させ、該感染の前または後に、抗微生物作用を有する化合物またはそれを含有する組成物からなる抗微生物剤を投与し、ついで病原微生物被感染部位を採取し、それを病原微生物を含む寒天培地上に置き培養後、前記病原微生物被感染部位の周囲に観察される病原微生物の発育阻止により前記病原微生物被感染部位に存在する抗微生物剤を検出する抗微生物剤の検出法。
12. 式 (I) :



(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なって水素原子、 $C_{1\sim6}$ アルキル基、無置換またはハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基および $C_{1\sim6}$ アルキル基から選ばれた置換基 1~3 個で置換されたアリール基、 $C_{2\sim8}$ アルケニル基、 $C_{2\sim6}$ アルキニル基、または $C_{7\sim12}$ アラルキル基を示し、 m は 2 または 3 を示し、 n は 1 または 2 を示す) で表される基を有する抗真菌化合物またはその塩を有効成分として含有する爪真菌症治療剤。

13. 前記化合物が式 (II) :



(式中、Arは無置換またはハロゲン原子およびトリフルオロメチルから選ばれた置換基1～3個で置換されたフェニル基を示し、R¹およびR²は、同一または異なって水素原子、C₁～₆アルキル基、無置換またはハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基およびC₁～₆アルキル基から選ばれた置換基1～3個で置換されたアリール基、C₂～₈アルケニル基、C₂～₆アルキニル基、またはC₇～₁₂アラルキル基を示し、mは2または3を示し、nは1または2を示し、Xは窒素原子またはCHを示し、*1、*2は不斉炭素を示す)で表される化合物である請求の範囲第12項記載の爪真菌症治療剤。

14. 前記式(II)の化合物が(2R, 3R) - 2 - (2, 4 - ジフルオロフェニル) - 3 - (4 - メチレンピペリジン - 1 - イル) - 1 - (1H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 1 - イル) ブタン - 2 - オールである請求の範囲第13項記載の爪真菌症治療剤。
15. 真菌が皮膚または爪に感染した患者に抗真菌剤を投与し、そののち角質または爪を採取し、ついで該抗真菌剤を除去したのち、角質または爪に生存する真菌を検出することからなる抗真菌剤の薬効評価法。
16. 真菌が皮膚または爪に感染した患者に、抗真菌剤を投与し、そののち角質または爪を採取し、それを真菌を含む寒天培地上に置き培養後、前記角質または爪の周囲に観察される真菌の発育阻止により前記角質または爪に存在する抗真菌剤を検出する抗真菌剤の検出方法。
17. 請求の範囲第15項記載の抗真菌剤の薬効評価法に

基づいて得られる抗真菌剤。

FIG. 1(a)

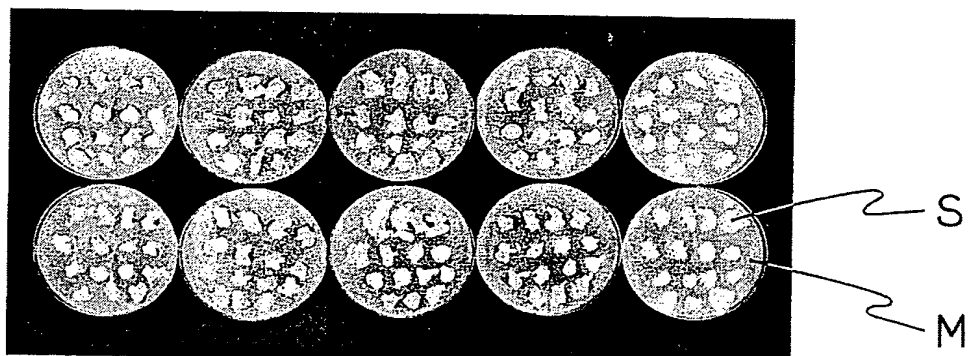


FIG. 1(b)

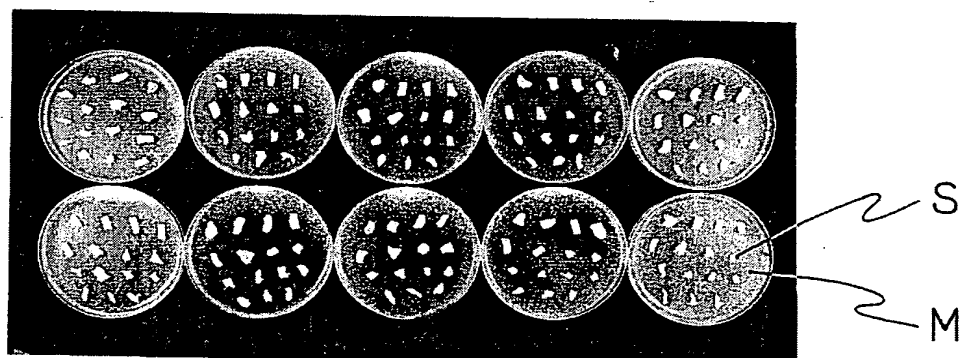


FIG. 1(c)

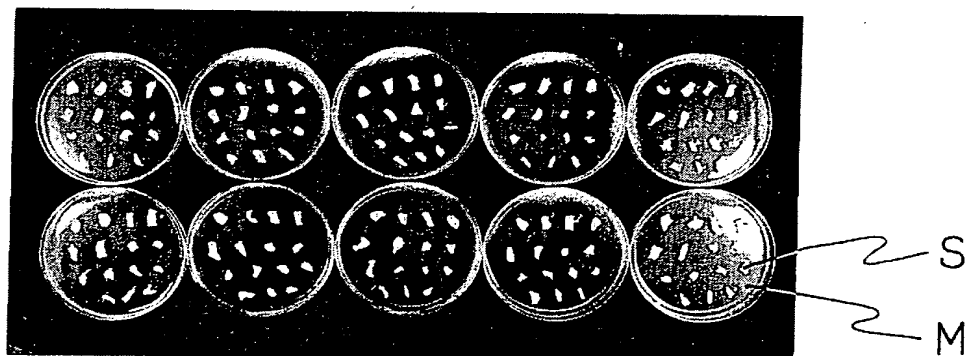


FIG. 2(a)

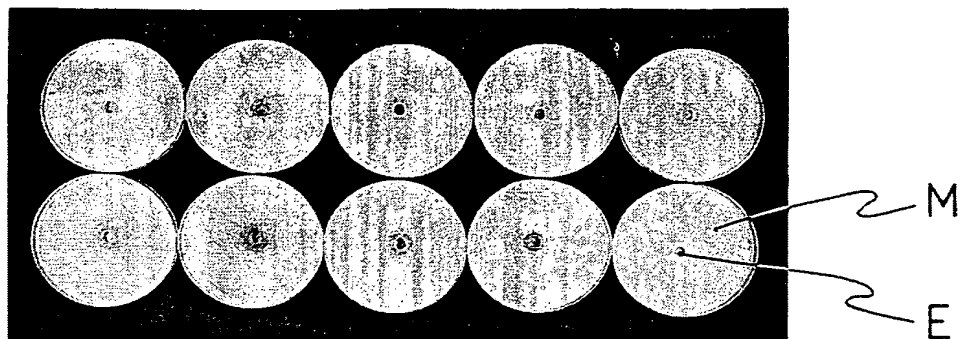


FIG. 2(b)

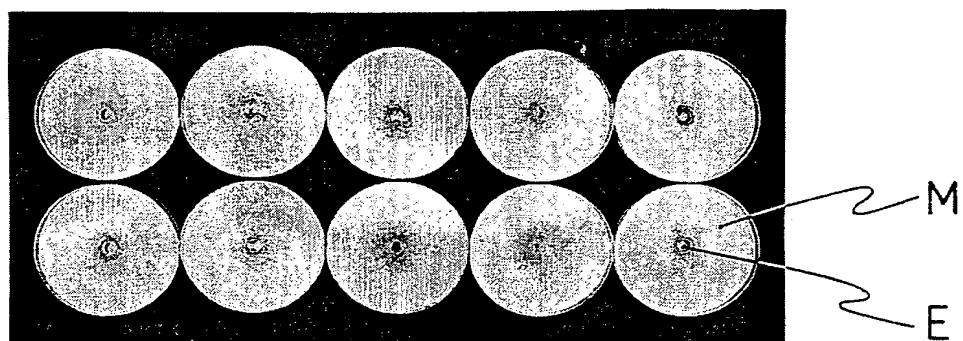


FIG. 2(c)

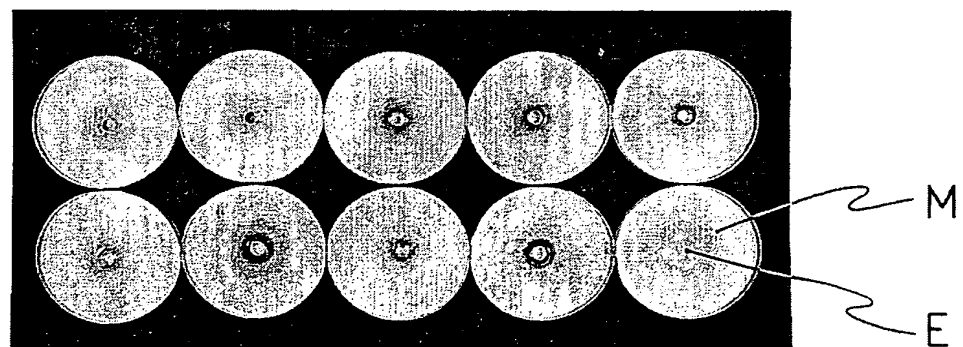


FIG. 3

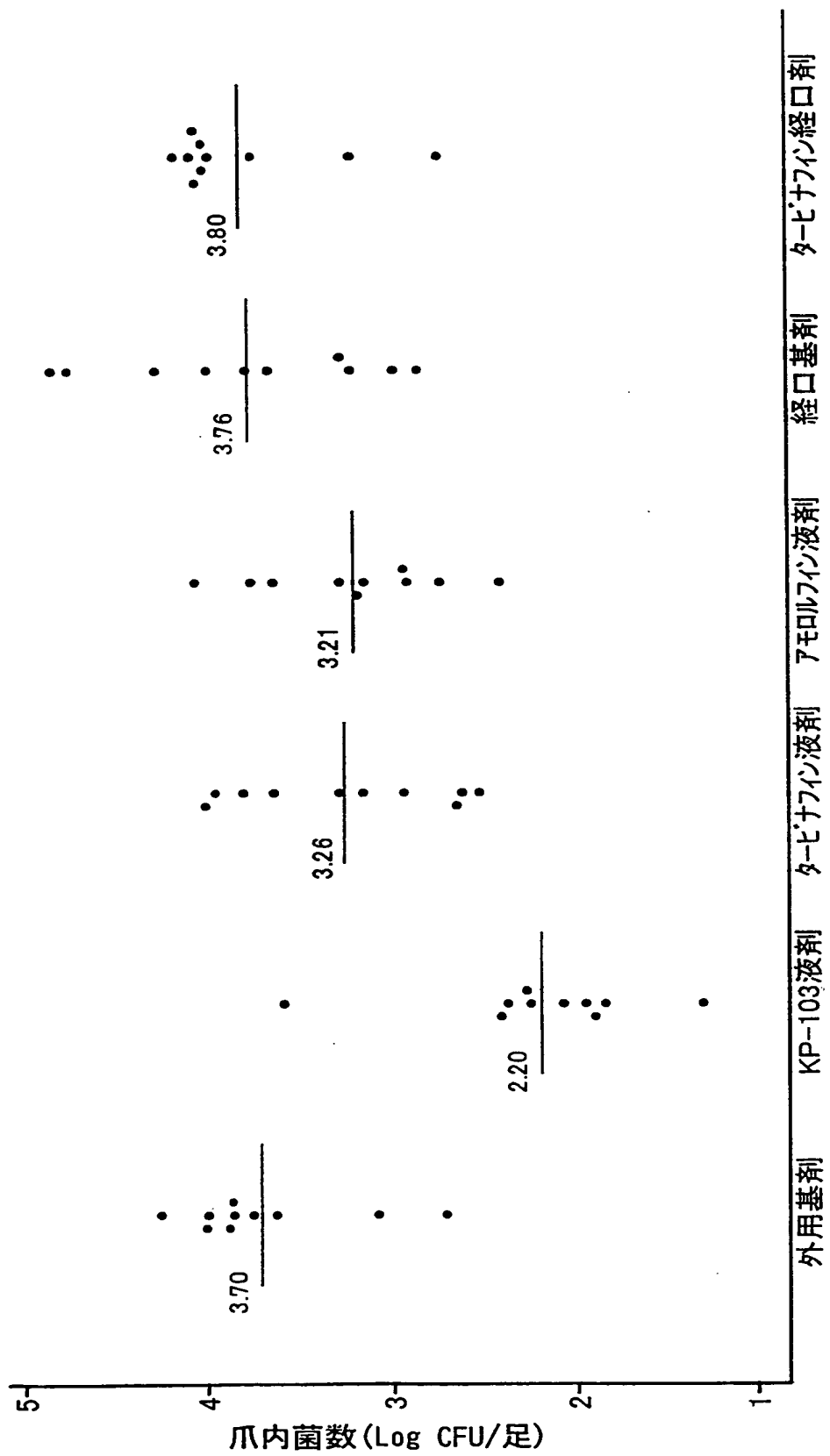
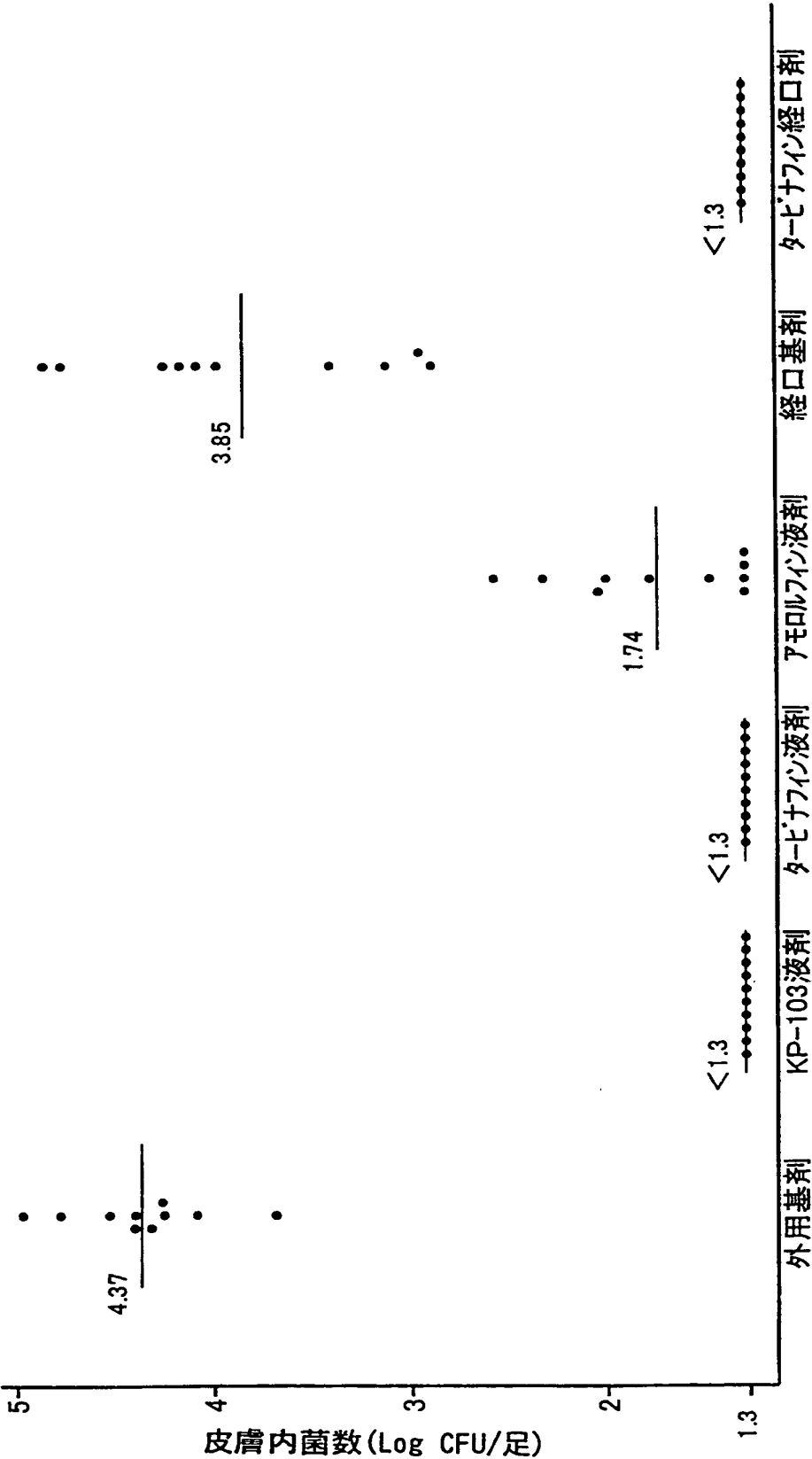


FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP, 8-103291, A (Pola Chemical Industries Inc.), 23 April, 1996 (23.04.96) (Family: none)	11, 16/1-9, 15
Y	JP, 10-28597, A (Gunze Limited), 03 February, 1998 (03.02.98) (Family: none)	1-9, 15
X	WO, 94/26734, A1 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 November, 1994 (24.11.94) & EP, 698606, A1 & US, 5620994, A & US, 5716969, A & US, 5962476, A	10, 12-14, 17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 September, 2000 (14.09.00)

Date of mailing of the international search report
03 October, 2000 (03.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04617

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims 1 to 10 and 15 to 17 pertain to a method for detecting a pathogenic microorganism; a method for evaluating the drug effect of an antimicrobial agent which comprises detecting a pathogenic microorganism by the method for detecting a pathogenic microorganism; and antimicrobial agents obtained by the drug effect evaluation method.

Inventions as set forth in claims 12 to 14 pertain to remedies for nail mycosis having a specific structure.

These two groups of inventions have no idea in common based on a technical matter. Such being the case, these two groups of inventions, which are different from each other, do not have any technical relevancy to each other in the meaning as specified in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP, 8-103291, A (ボーラ化成工業株式会社) 23.04月.1996 (23.04.96) ファミリーなし	11, 16/ 1-9, 15
Y	JP, 10-28597, A (グンゼ株式会社) 03.02月.1998 (03.02.98) ファミリーなし	1-9, 15
X	WO, 94/26734, A1 (科研製薬株式会社) 24.11月.1994 (24.11.94) & EP, 698606, A1 & US, 5620994, A & US, 57 16969, A & US, 5962476, A	10, 12-14, 17

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.09.00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

4N

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-10、15-17に記載された発明は、病原微生物の検出法、病原微生物の検出法により病原微生物を検出することからなる抗微生物剤の薬効評価法、薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤である。

請求の範囲12-14に記載された発明は、特定の構造を有する爪真菌症治療剤である。

上記両請求の範囲に記載された発明の間に技術事項に基づく共通の概念は存在せず、それらの相違する発明の間にPCT規則13.2の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ASAHINA, Sohta
NS Building
2-22, Tanimachi 2-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0012
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 18 September 2000 (18.09.00)	
Applicant's or agent's file reference FP-6750PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04617	International filing date (day/month/year) 11 July 2000 (11.07.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 28 July 1999 (28.07.99)
Applicant KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
28 July 1999 (28.07.99)	11/214369	JP	25 Augu 2000 (25.08.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Sean Taylor Telephone No. (41-22) 338.83.38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------

SAS



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

ASAHINA, Sohta
NS Building
2-22, Tanimachi 2-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0012
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 01 February 2001 (01.02.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference FP-6750PCT			
International application No. PCT/JP00/04617	International filing date (day/month/year) 11 July 2000 (11.07.00)	Priority date (day/month/year) 28 July 1999 (28.07.99)	
Applicant KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AG,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU.
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
01 February 2001 (01.02.01) under No. WO 01/07643

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年2月1日 (01.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/07643 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/18, A61K 31/454, A61P 31/10, G01N 33/15, 33/50 (JP). 有可 正 (ARIKA, Tadashi) [JP/JP]; 〒565-0802 大阪府吹田市青葉丘南8-T201 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04617 (74) 代理人: 朝日奈宗太, 外 (ASAHINA, Sohta et al.); 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目2番22号 NSビル Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2000年7月11日 (11.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/214369 1999年7月28日 (28.07.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科研製薬株式会社 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒113-8650 東京都文京区本駒込二丁目28番8号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 巽 良之 (TAT-SUMI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒520-0242 滋賀県大津市本堅田6丁目21-1-709 Shiga (JP). 横尾 守 (YOKOO, Mamoru) [JP/JP]; 〒520-0102 滋賀県大津市苗鹿2丁目13-3 Shiga (JP). 中村公章 (NAKAMURA, Kosho) [JP/JP]; 〒524-0002 滋賀県守山市小島町935-39 Shiga

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR DETECTING PATHOGENIC MICROORGANISM AND ANTIMICROBIAL AGENT, METHOD FOR EVALUATING THE DRUG EFFECT OF ANTIMICROBIAL AGENT, AND ANTIMICROBIAL AGENTS

(54) 発明の名称: 病原微生物および抗微生物剤の検出法、抗微生物剤の薬効評価法ならびに抗微生物剤

(57) Abstract: A novel method for evaluating the drug effect of an antimicrobial agent which comprises eliminating the antimicrobial agent remaining in a biological sample, etc. to thereby accurately evaluate the drug effect of the antimicrobial agent without being affected by the remaining antimicrobial agent. Remedies for nail mycosis which can be obtained by the drug effect evaluation method as described above.

(57) 要約:

生体試料などに残留する抗微生物剤を除去することにより、残留する該抗微生物剤の影響を受けず正確に該抗微生物剤の薬効を評価できる抗微生物剤の新規な薬効評価法を提供する。また、該薬効評価法により得ることができた爪真菌症治療剤を提供する。

WO 01/07643 A1



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ASAHINA, Sohta
NS Building
2-22, Tanimachi 2-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0012
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 30 March 2001 (30.03.01)		
Applicant's or agent's file reference FP-6750PCT		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/04617	International filing date (day/month/year) 11 July 2000 (11.07.00)	
		Priority date (day/month/year) 28 July 1999 (28.07.99)
Applicant KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, IL, JP, KP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CH, CR, CU, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW,
MX, MZ, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Kiwa Mpay <i>KMP</i> Telephone No. (41-22) 338.83.38
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST FILE (JOIS)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/Y</td> <td>JP, 8-103291, A (Pola Chemical Industries Inc.), 23 April, 1996 (23.04.96) (Family: none)</td> <td>11,16/1-9,15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP, 10-28597, A (Gunze Limited), 03 February, 1998 (03.02.98) (Family: none)</td> <td>1-9,15</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO, 94/26734, A1 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 November, 1994 (24.11.94) & EP, 698606, A1 & US, 5620994, A & US, 5716969, A & US, 5962476, A</td> <td>10,12-14,17</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X/Y	JP, 8-103291, A (Pola Chemical Industries Inc.), 23 April, 1996 (23.04.96) (Family: none)	11,16/1-9,15	Y	JP, 10-28597, A (Gunze Limited), 03 February, 1998 (03.02.98) (Family: none)	1-9,15	X	WO, 94/26734, A1 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 November, 1994 (24.11.94) & EP, 698606, A1 & US, 5620994, A & US, 5716969, A & US, 5962476, A	10,12-14,17
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X/Y	JP, 8-103291, A (Pola Chemical Industries Inc.), 23 April, 1996 (23.04.96) (Family: none)	11,16/1-9,15												
Y	JP, 10-28597, A (Gunze Limited), 03 February, 1998 (03.02.98) (Family: none)	1-9,15												
X	WO, 94/26734, A1 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 November, 1994 (24.11.94) & EP, 698606, A1 & US, 5620994, A & US, 5716969, A & US, 5962476, A	10,12-14,17												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family										
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search 14 September, 2000 (14.09.00)		Date of mailing of the international search report 03 October, 2000 (03.10.00)												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer												
Facsimile No.		Telephone No.												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04617

Box I Observations where certain claims were found and unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims 1 to 10 and 15 to 17 pertain to a method for detecting a pathogenic microorganism; a method for evaluating the drug effect of an antimicrobial agent which comprises detecting a pathogenic microorganism by the method for detecting a pathogenic microorganism; and antimicrobial agents obtained by the drug effect evaluation method.

Inventions as set forth in claims 12 to 14 pertain to remedies for nail mycosis having a specific structure.

These two groups of inventions have no idea in common based on a technical matter. Such being the case, these two groups of inventions, which are different from each other, do not have any technical relevancy to each other in the meaning as specified in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

127
Translation

Applicant's or agent's file reference FP-6750PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04617	International filing date (day/month/year) 11 July 2000 (11.07.00)	Priority date (day/month/year) 28 July 1999 (28.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/18, A61K 31/454, A61P 31/10, G01N 33/15, 33/50		
Applicant KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 01 February 2001 (01.02.01)	Date of completion of this report 21 June 2001 (21.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

The inventions described in Claims 1-11 and 15-17 are methods for detecting pathogenic microorganisms, methods for evaluating the effectiveness of antimicrobial agents which comprise detecting pathogenic microorganisms by the methods for detecting pathogenic microorganisms, and antimicrobial agents obtained using the methods of evaluating effectiveness.

The inventions described in Claims 12-14 are agents having a specified structure, for treating nail mycosis.

There is no technical relationship among these inventions which involves one or more of the same or corresponding technical features, and therefore they are not so linked as to form a single general inventive concept.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-9, 15	YES
	Claims	10-14, 16, 17	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 11 and 16

Document 1 (JP, 8-103291, A (Pola Chemical Industries Inc.), 23 April 1996 (23.04.96)) discloses a method for evaluating antimycotic agents, characterized in that the test substances is administered after transferring a superficial skin mycosis pathogen to animal skin or before said transfer, culturing small fragments of skin sampled immediately after said implantation, and determining the quantity of fungus in the skin by determining the size of colonies.

The method of evaluation and features of the inventions described in Claims 11 and 16 are the same as those disclosed in Document 1, and are, therefore, not novel.

Claims 10, 12-14 and 17

Document 2 (WO, 94/26734, A1 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 24 November 1994 (24.11.94)) discloses anti-mycotic agents which contain as an effective ingredient a compound having a structure the same as the structure described in Claims 12-14 of the present application.

In the description of the present application, the compounds presented in Claims 12-14 are described as examples of antimicrobial agents obtained using a method

for evaluating effectiveness described in Claim 10 or 17, and thus the antimicrobial agents described in Claims 10 and 17 include the antimicrobial agents disclosed in Document 2.

Therefore, Claims 10, 12-14 and 17 are not novel.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The "antimicrobial agents" and "antimycotic agents" described in Claims 10 and 17 are specified only by the method for evaluating effectiveness used to select the aforementioned agents.

Moreover, although the description offers compounds having a group represented by Formula (I) as examples of aforementioned agents, the aforementioned compounds are merely examples, and the description does not specify the constitution of agents other than the aforementioned compounds except that they are "antimicrobial agents obtained using the method for evaluating effectiveness".

Therefore, Claims 10 and 17 do not clearly describe the "antimicrobial agents" and "antimycotic agents" therein, and the aforementioned agents are not fully supported by the description.

15T

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 06 JUL 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 FP-6750PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04617	国際出願日 (日.月.年) 11.07.00	優先日 (日.月.年) 28.07.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl ¹ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50		
出願人(氏名又は名称) 科研製薬株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☒ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 01.02.01	国際予備審査報告を作成した日 21.06.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 山村 祥子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9217

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | |
|-------------------------------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☒ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

請求の範囲1-11、15-17に記載された発明は、病原微生物の検出法、病原微生物の検出法により病原微生物を検出することからなる抗微生物剤の薬効評価法、薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤である。

請求の範囲12-14に記載された発明は、特定の構造を有する爪真菌症治療剤である。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-9, 15	有
	請求の範囲	10-14, 16, 17	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-17	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-17	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲11, 16

文献1: JP, 8-103291, A (ポーラ化成工業株式会社) 23.04月.1996 (23.04.96)
には、動物の皮膚に表在性表菌症原因菌を移植した後または当該移植前に被検体を投与し、しかる後に皮膚より採取した小断片を培養し、当該培地上に生育したコロニーの大きさを測定して皮膚内の真菌を定量することを特徴とする抗真菌剤の評価法が記載されている。

請求の範囲11, 16に記載された発明は、上記文献1に記載された評価法と構成が同じであり、新規性を有さない。

請求の範囲10, 12-14, 17

文献2: WO, 94/26734, A1 (科研製薬株式会社) 24.11月.1994 (24.11.94)
には、本願請求の範囲12-14に記載された構造と同一の構造を有する化合物を有効成分として含有する抗真菌剤が記載されている。

なお、本願明細書では、請求の範囲12-14に示された化合物が請求の範囲10または17記載の薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤の具体例として記載されており、してみれば、請求の範囲10, 17に記載された抗微生物として文献2に記載された抗真菌剤も含まれるものと認められる。

故に、請求の範囲10, 12-14, 17は新規性を有さない。

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 10 又は 17 に記載の「抗微生物剤」及び「抗真菌剤」は、前記剤が選択される薬効評価法でのみ特定されている。

また前記剤の例として明細書には式 (I) で表される基を有する化合物が記載されているものの、前記化合物は単なる一例であり、明細書には前記化合物以外の「薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤」の構成についての記載は存在しない。

故に、請求の範囲 10、17 に記載の記載は「抗微生物剤」又は「抗真菌剤」の記載として不明瞭であり、また、明細書にも前記剤についての十分な裏付けが存在しない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V.2. 欄の続き

請求の範囲 1 - 9, 15

文献 3 : JP, 10-28597, A (グンゼ株式会社) 03.02月. 1998 (03.02.98)
には、皮膚モデルを被検物質で処理した後、かかる被検物質を除去し、更に皮膚モデルを培養液中で培養し、生細胞数を測定する皮膚刺激判定方法が記載されている。
被検物質で皮膚モデルを処理した後に被検物質を除去してから培養を行う構成を、文献 1 記載の方法に付加することは、当該技術分野の専門家にとって自明のものである。



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 FP-6750PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/04617	国際出願日 (日.月.年) 11.07.00	優先日 (日.月.年) 28.07.99	
出願人(氏名又は名称) 科研製薬株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-10, 15-17 に記載された発明は、病原微生物の検出法、病原微生物の検出法により病原微生物を検出することからなる抗微生物剤の薬効評価法、薬効評価法に基づいて得られる抗微生物剤である。

請求の範囲 12-14 に記載された発明は、特定の構造を有する爪真菌症治療剤である。

上記両請求の範囲に記載された発明の間に技術事項に基づく共通の概念は存在せず、それらの相違する発明の間にPCT規則13.2の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12Q1/18, A61K31/454, A61P31/10, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP, 8-103291, A (ポーラ化成工業株式会社) 23.04月.1996 (23.04.96) ファミリーなし	11, 16/ 1-9, 15
Y	JP, 10-28597, A (グンゼ株式会社) 03.02月.1998 (03.02.98) ファミリーなし	1-9, 15
X	WO, 94/26734, A1 (科研製薬株式会社) 24.11月.1994 (24.11.94) & EP, 698606, A1 & US, 5620994, A & US, 57 16969, A & US, 5962476, A	10, 12-14, 17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.09.00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

4N

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

